

ノート

高速液体クロマトグラフによる糖類の迅速定量分析法の検討

松代 康, 松井 真一*

Rapid Quantitative Analysis of Mono - and Oligosaccharides by High - Performance Liquid Chromatography

Yasushi MATSUSHIRO and Shinichi MATSUI*

*Kobe Customs Laboratory

12 - 1, Shinko - cho, Chuo - ku, Kobe - shi, 650 Japan

Quantitative analysis of mono - and oligo saccharides by high - performance liquid chromatography were investigated.

Analytical conditions were as follows : column HITACHI Gelpack GLC 614 ; column temperature 60°C ; eluent water; internal standard isobutanol; flow rate 1.00ml/min.; detector RI.

This method showed high reliability and having merit of easiness and rapidity for the analysis of not only many constituents of saccharides but also other water soluble constituents.

The studies proved the HPLC method is applicable to the analysis of a wide range of complex samples .

1 緒 言

単糖類, 二糖類の分析は, 食品分析における代表的な測定項目のひとつである。

税関分析においても, 輸出入食品中の糖類の含有量は, 当該物品の関税率表上及び輸出入制度上の取扱いを決定する上で重要な因子のひとつであり, 特にしょ糖の定量分析は食品類の分析依頼項目のなかで最も分析依頼頻度が高く, 分析業務上多くの時間を費やしているところである。

従来から我々は, 糖類の定量分析法として, レインエイノン法, ハーネス法, 酵素法等を用いてきたが,

これらの方法は煩雑な操作と熟練が必要である。最近, 食生活の変化と共に, 食料調製品の輸入が多くなり, 多種類の糖類を含有する物品の分析が増加している。

従来の方法による多種類の糖類を含有する物品の分析は, 操作が煩雑でかつ長時間を使い, また各糖類の定量精度についていくつかの問題点も報告^{1)~3)}されている。

近年, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の開発に伴い, 食品分析でも, 各種化合物の迅速かつ正確な分析法として広く利用されるようになり, 糖類の分析も HPLC による方法が一般的となってきた^{4)~11)}。

本報では, HPLC (Gelpack GL - C614 カラム, RI

* 神戸税關輸入部分析部門 〒650 神戸市中央区新港町 12 - 1

検出器)による、単糖類、二糖類の定量分析法について実験を行い、分析方法の信頼性及び実用性と、実際の多様なサンプルに対するアプリケーションを検討した。

2 実験

2.1 実験条件

2.1.1 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ	日立	L-6000形(流速1.00ml/min)
サンプリングエクタ	レオダイン	885-0120スタ-トスイッチ付
カラムオ-ブン	日立	655A-52形(カラム温度60°)
カラム	日立化成	Gelpack GL-C614
(糖、糖アルコ-ル分析カラム		理論段数5000以上 10.7mm X300mm)
RI検出器	日立	L-3300形(1/64~32X10 ⁻⁵ RIU)
クロマトデータ処理装置	日立	D-2500形

2.1.2 試薬器具

標準試薬	しょ糖、ぶどう糖果糖乳糖(試薬特級、米山薬品)
その他単糖類、二糖類、ソリビトール、エリアロコール等	
内部標準	イソブチルアルコール(試薬特級米山薬品)
溶離液	蒸留水(HPLC用、米山薬品)を超音波滅菌脱気したもの
試料前処理用カートリッジ	TOYOPAKIC-SPM(東ソー)
(イオン交換樹脂)	TOYOPAK DEMEM(東ソー)
精密ろ過用フィルター	13mm 0.45μ水系(日本ミリポア)
	25mm 0.80μ水系(アドリテック東洋)

2.2 分析法の検討

2.2.1 リテンションタイムの確認

各標準試薬の1%水溶液を、流速1.00ml/min、カラム温度60°の条件で注入し、それぞれのリテンションタイム(RT)を確認した。

2.2.2 検量線の作成

しょ糖、ぶどう糖、果糖及び乳糖について、イソブタノールを内部標準として検量線を作成した。各種濃度の検液2容量に対し、2.5%(V/V)イソブタノール水溶液1容量を加え、HPLCに注入しクロマトグラム上の各糖類のピーク高さをイソブタノールのピークの高さで割ったものをファクターとし、濃度とファクターの直線関係を確認した。

2.2.3 定量値の繰り返し測定による精度の確認

しょ糖、ぶどう糖、果糖、及び乳糖について、イソブタノールを内部標準として、1%及び0.1%濃度定量値の繰り返し測定を行った。1日5回測定を2日にわたりて行い、変動係数を求めた。

2.2.4 前処理法の検討と回収試験

抽出、溶解、中和、脱脂、揮発成分除去、除たんぱく、イオン性の強い物質の除去、ろ過等の前処理法を検討した。

前処理操作が定量値に与える影響を1%と0.5%レベルの標準回収試験で確認し、さらに市販の清涼飲料水をベースに標準添加回収試験を行った。

2.3 実際の輸出入サンプルの分析

2.2で検討したHPLC法(水系カラム、ノンラベル、RI検出、イソブタノール内部標準法)により、キヤンダー、梅酒、にんじんジュース、中国産刺梨果汁、天然はちみつ、穀粉調製品、でん粉誘導体の分析を行った。

3 結果及び考察

3.1 分析法の考察

3.1.1 カラムの特性と溶出時間

今回使用したカラムは、金属イオンを付加したスルホン化ポリスチレン系ゲルを使用しており、分子ふるい効果の他に金属イオンとの錯形成効果を利用し、糖の分離を行う。分子ふるい効果によりおよそ分子サイズ別に分離するが、錯形成効果により分子量の等しいものの分離も可能^{1,2)}である。特記すべき特性として有機溶媒を使わず、100%蒸留水を使う点があげられ、非常に扱いやすいカラムといえる。

分離条件は、流速1.00ml/min.カラム温度60°とした。カラムを加温するのは、遊離糖の溶液中のアノマー変換速度を速めピークを見かけ上シャープにする効果が得られるからである。

Fig. 1に各種単糖類、二糖類のリテンションタイムを示す。このカラムの分離特性は二糖類の分離に優れていることである。特にしょ糖のリテンションタイムは他の糖類より早く、他の糖の影響を受けにくいので、

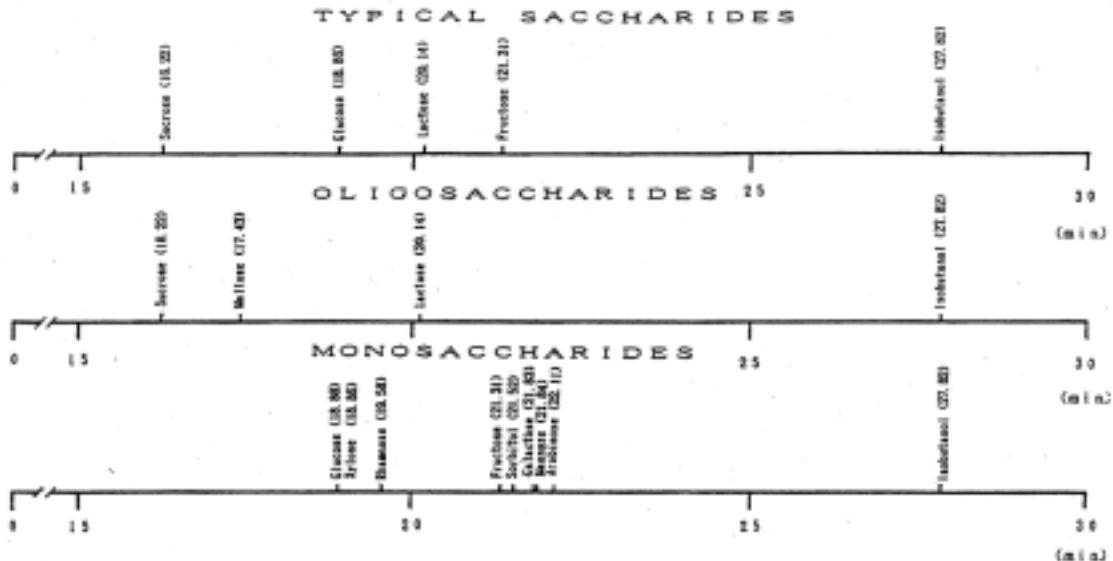


Fig.1 Retention time of saccharides

Column : HITACHI Gelpack GL - C614
 Eluent : Water
 Flow rate : 1.00 ml / min.
 Detector : RI
 Column temp. : 60

しょ糖の定量値の正確さが特に要求される分析には好適なカラムである。

3.1.2 測定濃度レベルの検討と検量線の作成
 1%, 0.1%, 0.01%濃度レベルのしょ糖, ぶどう糖, 果糖のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。1%レベルでは, ベースラインの安定した, 理想的なクロマトグラムが得られる, 0.1%レベルでは, ベースラインに微弱な乱れと, しょ糖のピークのあとに小さな落ち込みがみられるが, 実用的には大きな影響はないと考える。0.01%レベルでは, ベースラインが大きく乱れることから, 安定した定量分析は望めない。しかしながらピークは十分確認できるので検出手段としては使える。

今回のRI検出器, ノンラベル法は微量分析には向きであるので, カラムへの負荷を考慮すると, HPLCへの注入濃度は, 1%レベルで分析するのが理想

的であるといえる。

RT27.8min. のピークは, 内部標準として選定したイソブタノールのピークである。イソブタノールを内部標準として選んだ理由は, 振発性が低く, 安定性がよく, 水溶性であり, RT が糖類から離れていることによる。

2~10%でのしょ糖, ぶどう糖, 果糖, 乳糖のイソブタノール内部標準法による5点検量線を Fig. 3 に示す。ほぼ原点を通る直線が得られ, 相関係数は, いづれも $r=0.9999$ 以上である。

0.2~1.0%でのしょ糖, ぶどう糖, 果糖, 乳糖のイソブタノール内部標準法による5点検量線を Fig. 4 に示す。ほぼ原点を通る直線がえられ, 相関係数は, いづれも $r=0.9999$ 以上である。

このように, 比較的広い濃度範囲にわたって安定した直線関係が得られることが判った。

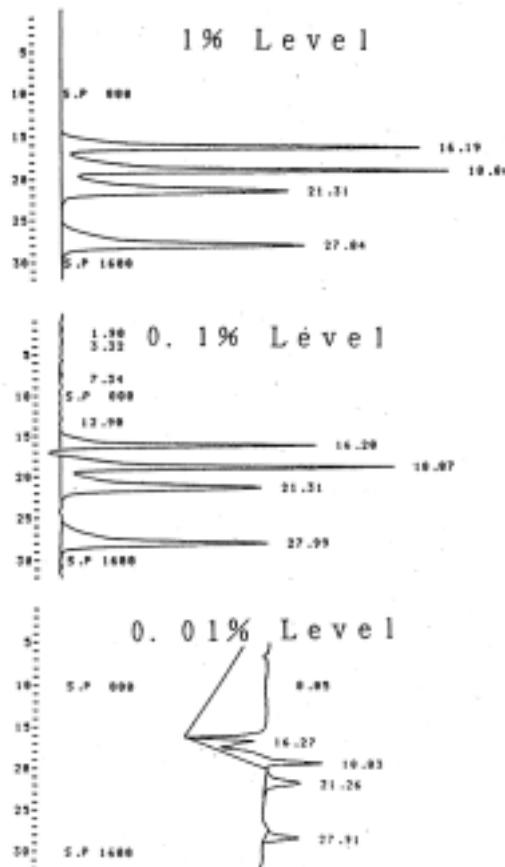


Fig. 2 Chromatogram of Sucrose, Glucose, Fructose and Isobutanol

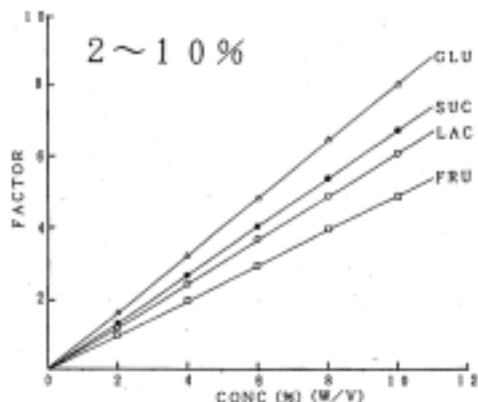


Fig. 3 Calibration curve of saccharides by isobutanol INT - STD method

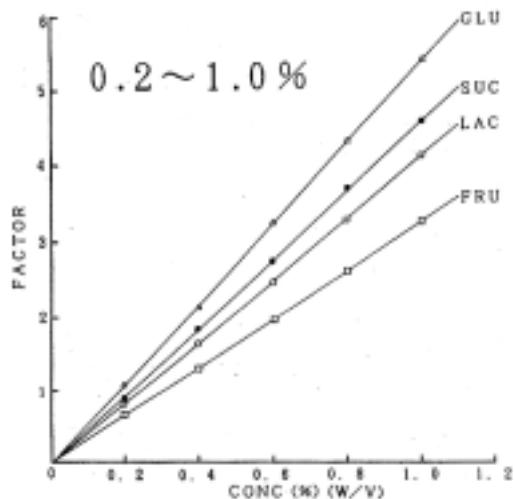


Fig. 4 Calibration curve of saccharides by isobutanol INT - STD method

3.1.3 定量値の繰り返し測定による精度の確認

Table 1 にしょ糖,ぶどう糖,果糖の混合物としょ糖,乳糖の混合物のイソブタノール内部標準法による 1% 定量値 (W/V) を 5 回繰り返して測定した結果を示す。Table 2 は同様の試験を日を改めて行ったものである。変動係数 (CV (%)) はいずれもほぼ 0.5 以下であり, 高い精度が得られた。

Table 3 及び Table 4 に同様の試験を 0.1% 定量値について 2 日にわたって行った結果を示す。変動係数 (CV (%)) はいずれもほぼ 2 以下であり, 比較的

Table 1 1% (W/V) Level quantitative test (1st day)

	SUC	GLU	FRU	SUC	LAC
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	0.993	0.995	1.003	1.002	0.998
3	0.998	1.001	1.008	0.993	1.003
4	0.983	0.999	1.005	1.009	0.999
5	0.981	1.001	1.008	0.991	1.005
AVE	0.989	0.992	1.005	0.993	1.001
STD	0.007	0.002	0.003	0.004	0.003
CV (%)	0.006	0.223	0.304	0.373	0.303

Isobutanol INT-STD method

Table 2 1% (W/V) Level quantitative test (2nd day)

	SUC	GLU	FRU	SUC	LAC
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	0.989	1.001	0.998	1.005	1.008
3	0.993	1.000	0.997	1.001	1.006
4	0.993	0.999	0.998	1.003	1.011
5	0.995	1.001	1.000	1.001	1.011
AVE	0.994	1.002	0.999	1.002	1.007
STD	0.004	0.001	0.001	0.002	0.004
CV (%)	0.360	0.075	0.120	0.179	0.404

Isobutanol INT-STD method

Table 3 0.1% (W/V) Level quantitative test (1st day)

	SUC	GLU	FRU	SUC	LAC
1	0.1000	0.1000	0.1000	0.1000	0.1000
2	0.1014	0.1008	0.1002	0.0992	0.0991
3	0.1023	0.1025	0.1060	0.0993	0.0997
4	0.1017	0.1010	0.1018	0.0993	0.1017
5	0.1006	0.1010	0.1007	0.1008	0.1009
AVE	0.1008	0.1011	0.1017	0.0997	0.1005
STD	0.0013	0.0008	0.0022	0.0006	0.0011
CV (%)	1.26	0.806	2.181	0.613	1.113

Isobutanol INT-STD method

Table 4 0.1% (W/V) Level quantitative test (2nd day)

	SUC	GLU	FRU	SUC	LAC
1	0.1000	0.1000	0.1000	0.1000	0.1000
2	0.1013	0.1007	0.1011	0.0991	0.0994
3	0.0983	0.1002	0.1003	0.0995	0.1011
4	0.0983	0.1007	0.1000	0.0998	0.1019
5	0.0954	0.1013	0.1007	0.1007	0.1017
AVE	0.0996	0.1005	0.1005	0.0996	0.1010
STD	0.0020	0.0004	0.0004	0.0004	0.0007
CV (%)	1.96	0.384	0.388	1.435	0.723

Isobutanol INT-STD method

高い精度が確認された。

3.1.4 前処理法の検討と回収試験

今回使用しているカラムには、疎水性の物質や、イオン性の強い物質等は注入できないので、抽出、溶解、中和、脱脂、揮発性成分の除去、たんぱく質の除去、

イオン性の強い物質の除去、ろ過等、適切な前処理が必要である。

Fig. 5 に検討した前処理法を示す。通常はこれらの操作をすべて行う必要はなく、サンプルに応じて必要な処理のみを行えばよい。ただし、0.45 μ フィルターによる精密ろ過はカラムの保守上欠かさず行うべきである。

Table 5 に秤量、溶解、除たんぱく、定容、ペーパーろ過、カートリッジタイプイオン交換樹脂による脱塩操作、0.45 μ フィルターによる精密ろ過、内部標準添

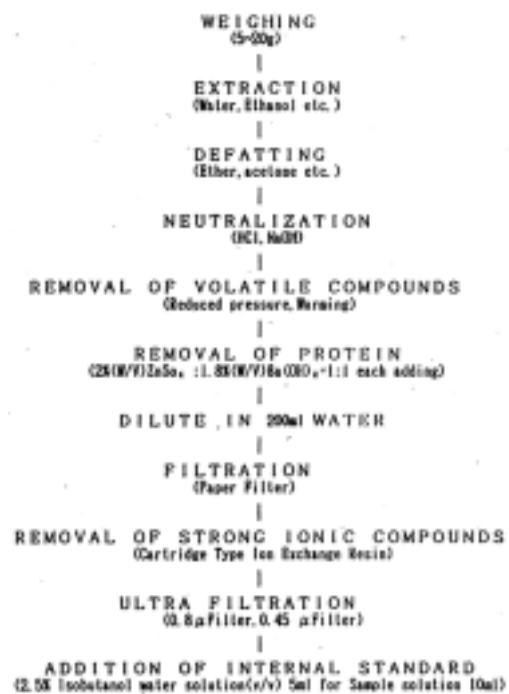


Table 5 Recovery Test Accompanied by Preparation

CONC	RECOVERY (%)		
	SUC	GLU	FRU
1%	100.5	101.4	101.2
0.5%	98.5	100.2	99.8

Pretreatment
Weighing → Extraction → Deproteinizing → Dilution → Filtration (paper) → Removal of strong ionic compounds (Cartridge type ion exchange resin) → Ultra filtration (0.45 μ) → Addition of internal standard → HPLC

Table 6 Recovery of sugars added in a Beverage (POCARI SWEAT)

CONC (w/w) (%)					
	ANAL. VAL.	ADD. VAL.	ANAL. VAL. AFTER ADD.	INCREMENTS	RECOVERY (%)
SUC	3. 64	1. 00	4. 61	0. 97	97
GLU	1. 25	1. 00	2. 22	0. 97	97
FRU	1. 16	1. 00	2. 13	0. 97	97

Addition of standard sugars to a beverage (1% w/w)

Procedures 8 Removal of strong ionic compounds (ion exchange)

Ultra filtration (0.45 μ)

Addition of internal standard

HPLC

加の連続操作に伴う、しょ糖、ぶどう糖、果糖の1%及び0.5%定量値の回収率を示す。前処理の定量値に与える影響はほとんど無視できるレベルであるといえよう。

Table 6 に清涼飲料水(ポカリスエット)を用いた標準添加回収試験の結果を示す。しょ糖、ぶどう糖、果糖をそれぞれ1%添加したところ、良好な回収率が得られた。

3.2 実際の輸出入サンプルの分析

3.1 での検討を踏まえて、実際の輸出入サンプル中の糖類の定量分析にイソブタノールを内部標準として用いた。

クロマトデータ処理装置により、溶出時間より糖類の同定、各糖類のピーク高と内部標準のピーク高の比より検量線の作成と定量を行った。

3.2.1 キャンデーの分析

Fig. 6 にキャンデーの分析例を示す。前処理は秤量、溶解、希釈定容、0.45 μ フィルターによる精密ろ過を行った。しょ糖、ぶどう糖、果糖を同時に同定、定量した結果、しょ糖の含有量が極めて多いことが判った。

データ処理装置より打ち出されてくる定量値は HPLC に注入した検液中の濃度 (W/V) であるので、サンプルの秤量値と希釈定容より計算すれば、サンプル中の濃度 (W/W) が得られる。(以下の Fig. 中に示されている濃度は、サンプル中の濃度 (W/W))。

3.2.2 梅酒の分析

Fig. 7 に梅酒の分析例を示す。前処理は秤量、中和、エタノール除去、希釈定容、0.45 μ フィルターによる

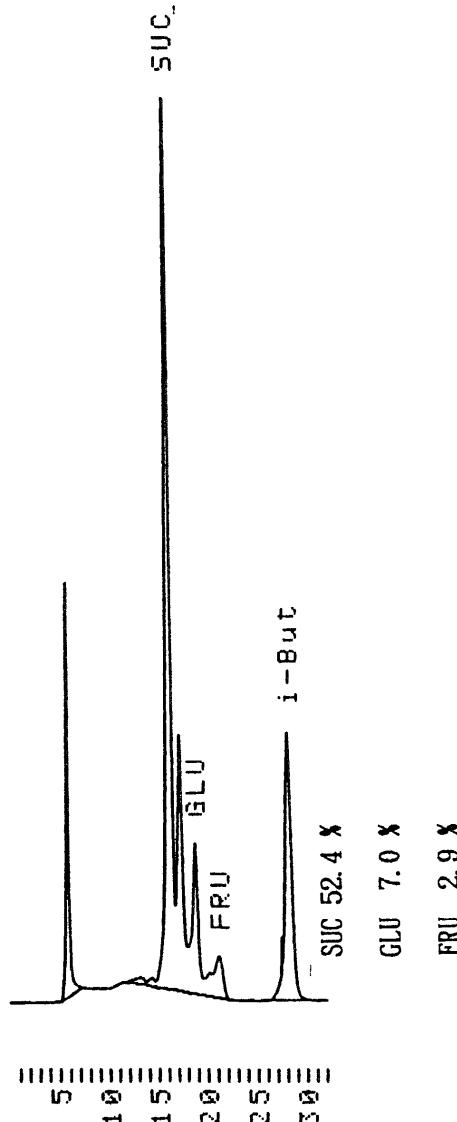


Fig. 6 Chromatogram of a candy

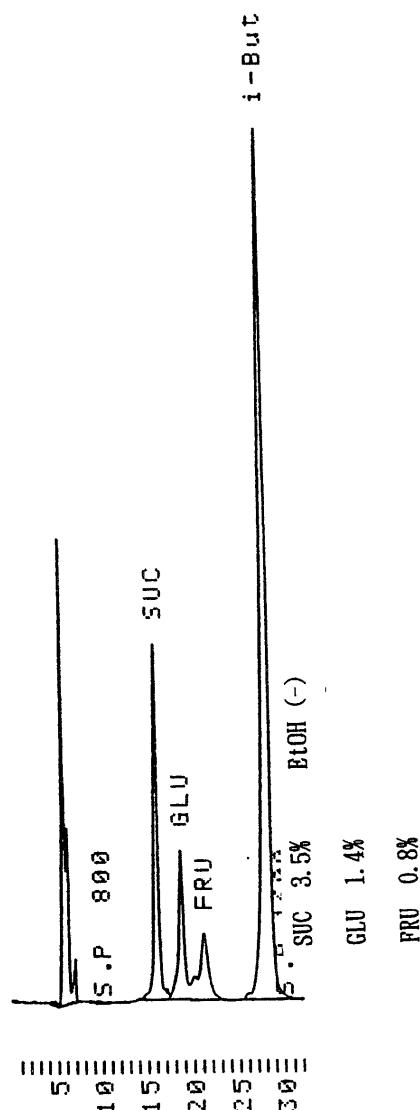
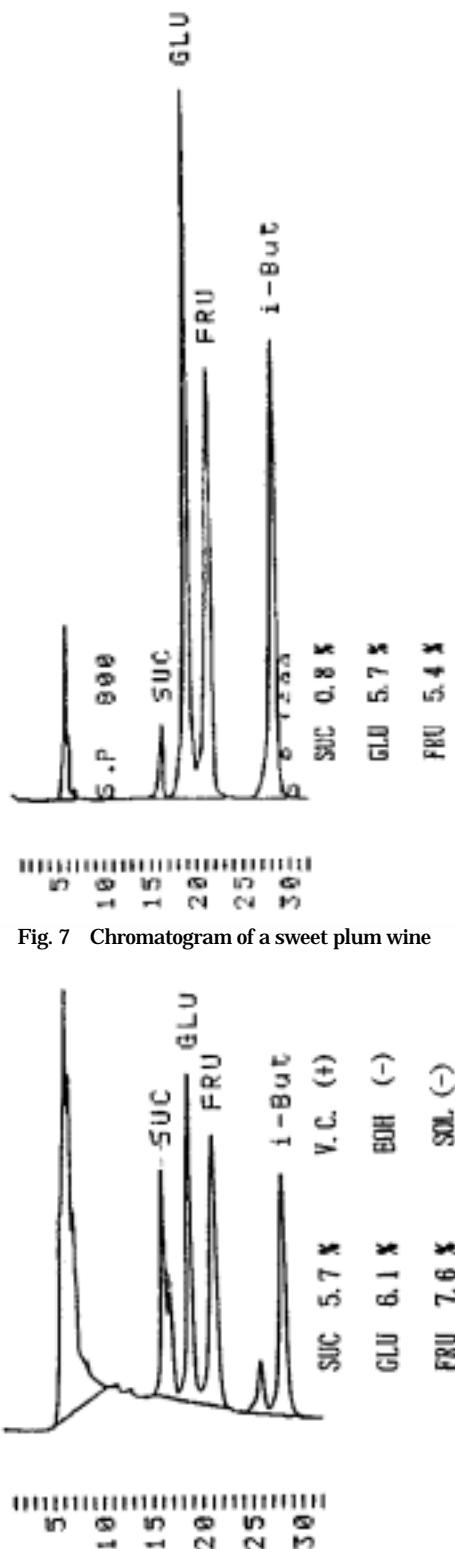


Fig. 9 Chromatogram of a chinese fruit (刺梨) juice

精密ろ過を行った。しょ糖、ぶどう糖、果糖を同時に同定、定量した結果、ぶどう糖と果糖の含有量がほぼ等しいことから、有機酸によりしょ糖が分解して生成したものと推定される。

3.2.3 にんじんジュースの分析

Fig. 8 に、にんじんジュースの分析例を示す。前処理は秤量、除タンパク、希釈定容、ペーパーフィルターによるろ過、0.45 μ フィルターによる精密ろ過を行った。しょ糖、ぶどう糖、果糖を同時に同定、定量した

結果、しょ糖が多く含まれていることが判った。エタノールの RT にピークがないことから、エタノールは含有されないことが同時に確認できた。

標準データを蓄積すればクロマトグラムのピークパターンによりジュースの種類の同定手段としても有効である。

3.2.4 中国産刺梨果汁の分析

Fig. 9 に中国産刺梨果汁の分析例を示す。前処理は秤量、中和、除タンパク、希釈定容、ペーパーフィルターによるろ過、 0.45μ フィルターによる精密ろ過を行った。

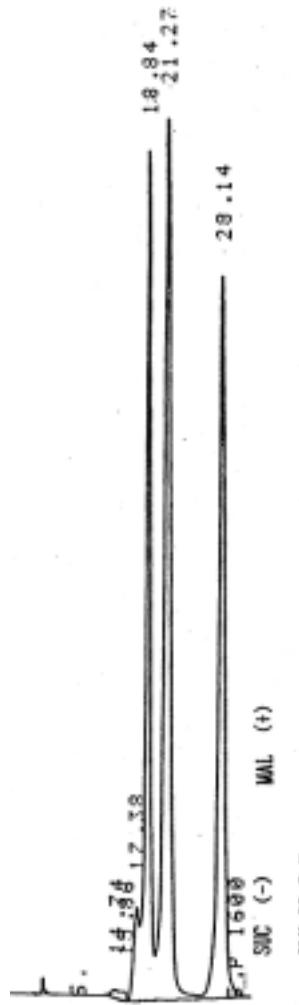


Fig. 10 Chromatogram of a natural honey

行った。しょ糖、ぶどう糖、果糖を同時に同定、定量した結果、3種類の糖は同様の値を示した。このサンプルについては成分等に関する参考文献が入手できなかったが、一般に梨類に多く含有されているソルビトールが検出されず、またビタミンCを多く含むことが同時に確認できた。

3.2.5 天然はちみつの分析

Fig. 10 に天然はちみつの分析例を示す。前処理は秤量、希釈定容、 0.45μ フィルターによる精密ろ過を行った。ぶどう糖、果糖を同時に同定、定量した結果、

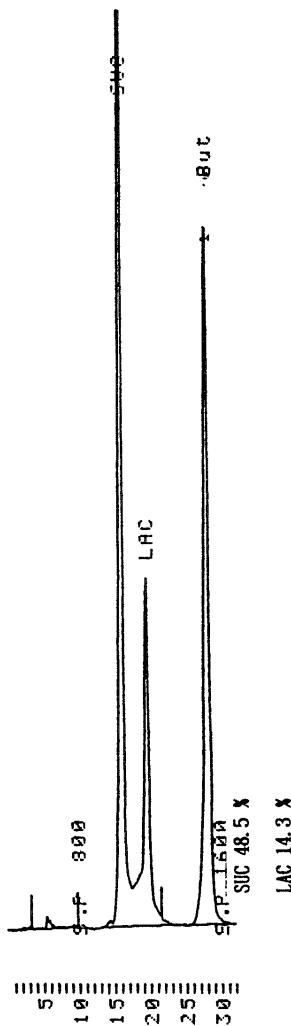


Fig. 11 Chromatogram of a food preparation (wheat flour, sugar, non fat drymilk)

果糖がぶどう糖よりも多く含まれ、しょ糖は殆ど検出されなかった。またマルトースの微弱ピークも同時に検出された。

3.2.6 穀粉調整品の分析

Fig. 11 に小麦粉、砂糖、脱脂粉乳の混合物として申告されたサンプルの分析例を示す。前処理は秤量、溶解、除タンパク、希釈定容、ペーパーフィルターによるろ過、 0.45μ フィルターによる精密ろ過を行った。

しょ糖、乳糖を同時に同定、定量した結果、しょ糖 49% と脱脂粉乳に由来する乳糖 14% が確認された。

3.2.7 でん粉誘導体の分析

Fig. 12 にヒドロキシプロピル化でん粉 (DS 0.04) の酵素グルコアミラーゼによる分解物の分析例を示す。でん粉から分解生成したぶどう糖が同定、定量されている。

未処理のでん粉にグルコアミラーゼを作用させると大部分がぶどう糖に分解されるが、でん粉誘導体にグルコアミラーゼを作用させると被置換水酸基を有するぶどう糖単位のところで反応が止まるので、ぶどう糖の生成率は置換度 (DS) が高くなるほど低下する。グルコアミラーゼによるぶどう糖の生成率を HPLC により測定することで、変成の有無、変成の程度 (置換度)、未処理でん粉混入の有無を確認することができる¹³⁾。

きる点で操作性に優れている。

特に多種類の糖類を含有する輸出入商品に応用した結果、信頼性のある分析値が迅速に得られ、広く応用が期待できることが示された。

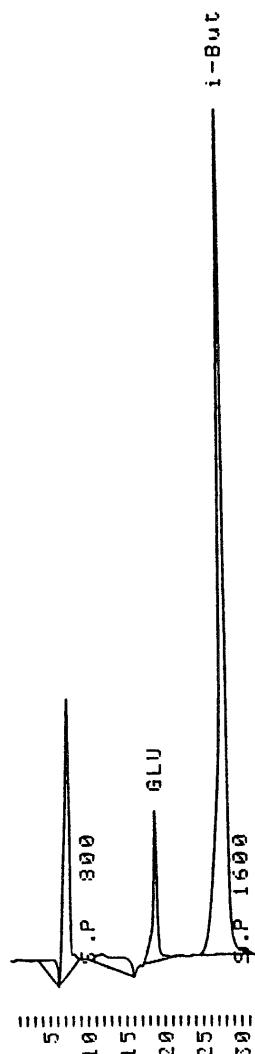


Fig. 12 Chromatogram of a degradation of hydroxypropyl group starch ethers by glucoamylase

4 要 約

高速液体クロマトグラフ (HPLC) (Gelpack GL-C614 カラム, RI 検出器) による单糖類、二糖類の定量分析法 (イソブタノール内部標準法) について検討した。

本法は注入濃度 0.1~10% レベルで、定量精度として十分な信頼性を備えており、かつ多成分の糖類を同時に同定、定量でき、他の水溶性成分も同時に同定で

文 献

- 1) 平松錦一：本誌，1, 23 (1965)
- 2) 平松錦一：本誌，3, 19 (1966)
- 3) 森好啓子、河本義昭：本誌，29, 59 (1989)
- 4) 鷹野重威：科学と工業，54, 6, 224 (1980)

- 5) 日本分析化学会関東支部 編：高速液体クロマトグラフ分析，産業図書（1982）
- 6) 倉田忠男：日本食品工業学会誌，35, 10, 723 (1988)
- 7) 宮城好弘，出来三男：本誌，19, 65 (1978)
- 8) 出来三男：本誌，23, 15 (1983)
- 9) Susumu Honda : ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 140 1 (1984).
- 10) 筧島 豊，松本 清，下田満哉，受田浩之：ぶんせき，201, 9, 690 (1991)
- 11) J.D.オレックナー，S.R.カーター：クロマトグラフ法による炭水化物分析の進歩，日本ダイオネクス応用技術部訳
- 12) Gelpack TECHNICAL INFORMATION, DATA NO [AH] - () - 2 , 日立化成工業 (1987)
- 13) 松代 康，矢ヶ崎国秀：本誌，30, 57 (1991)